Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Freiburg/Brg.
(Direktor: Professor Dr. K a p f h a m m e r.)

Beiträge zur biologischen Bestimmung des Acetylcholins

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Albert-Ludwig-Universität
zu Freiburg im Breisgau.

1936.

vorgelegt von

Werner von Ammon
Ingolstadt a. Donau.

Buchdruckerei Rudolph Pfau, Berlin NW 7, Luisenstraße 21.

1936

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Freiburg i. Br.

Dekan: Prof. Dr. Wegner
Referent: Prof. Dr. Kapfhammer

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Zur biologischen Untersuchung des Acetylcholin-Gehaltes in Blut und Geweben dienen heute meist der Meerschweinchen- oder Mäusedarm, der Rectus abdominis des Frosches und der Rückenmuskel des Blutegels.

Besonders häufig ist in der letzten Zeit der Blutegelmuskel verwendet worden. Das grundlegende Verfahren dafür stammt von Führer, der angab, daß bei gleichzeitiger Anwendung des Physostigmins der Egelmuskel gegen das Acetylcholin so empfindlich wird, daß er noch auf Acetylcholinverdünnungen von 1 : 100 Millionen zuverlässig anspricht.

Aus den vielen Arbeiten, die sich mit der physiologischen Bedeutung des Acetylcholins beschäftigen, greifen wir nur eine, erst in jüngster Zeit erschienene, Untersuchung von Strack und Mitarbeitern heraus; Strack verglich die biologische Wirkung des im Muskel vorkommenden Carnitin mit der des Acetylcholins und benützte den Mäusedarm und den Rectus abdomonis des Frosches. Er kommt zu dem Schluß, „daß Carnitin als Fehlerquelle bei den Cholinbestimmungen nicht in Frage kommt, wenn es sich nicht um den Nachweis kleinster Cholinmengen neben viel Carnitin handelt."

Wir haben Carnitin und Acetylcarnitin, das wir Herrn Strack verdanken, am Egelmuskel untersucht. Es ist auch hier im Vergleich mit Acetylcholin lange nicht so wirksam wie dieses; erst in einer weit stärkeren Konzentration verkürzt es den Egelmuskel.

Das Hauptziel unserer Arbeit war, zu ermitteln, ob die im physiologisch-chemischen Laboratorium zur Abscheidung der Eiweißstoffe gebräuchlichen chemischen Stoffe den Blutegelmuskel beeinflussen.

Im Verfolg dieses Zieles untersuchten wir dann weiter, ob die für die Darstellung des Acetylcholins brauchbaren, schwerlöslichen Verbindungen, unter denen wir das Salz der Goldchlorwasserstoffsäure und das der Reineckesäure herausgriffen, auf den Egelmuskel einwirken.

Vorbedingungen und Vorsorge dafür war, das Goldchlorid ($AuCl_3$), die freie Reineckesäure und deren Ammoniumsalz in ihrer eigenen Wirkungsfähigkeit auf den Egelmuskel kennen zu lernen.

Es lag auf der Hand, daß dann, wenn unsere Untersuchungen die Erkenntnis brachten, ob und wie die genannten chemischen Stoffe auf den Egelmuskel wirkten, daß dann diese Erkenntnis wegleitend für unsere Arbeitsrichtung war.

Wir nehmen das Hauptergebnis gleich vorweg: Weder die als Eiweißfällungsmittel vorzüglich brauchbare Pikrinsäure, noch das für die Darstellung des Acetylcholins unentbehrliche Goldchlorid und die dafür besonders geeignete Reineckesäure beeinflußten in den für die biologischen Untersuchungen üblichen Verdünnungen den Blutegelmuskel.

Der Vorteil dieser Tatsachen liegt auf der Hand: Wir haben dadurch jetzt die Möglichkeit, während der fortschreitenden Aufarbeitung des Blutes oder irgendwelcher Organe die anfallenden pikrinsäurehaltigen Lösungen in den verschiedenen Stufen des Arbeitsganges auf die Anwesenheit des Acetylcholins zu prüfen.

Wir haben dann weiter den Vorteil, daß wir die mit Goldchlorid oder mit Reineckesäure entstehenden Niederschläge, in geeigneter Lösung biologisch prüfen können, ob sie Acetylcholin enthalten oder nicht.

Versuchsteil.

Die ersten Versuche zum Nachweis des Acetylcholins wurden 1916 von Guggenheim und Löffler am isolierten Meerschweinchendarm ausgeführt, ebenso von Führer am überlebenden Froschherzen, in das eine Straubsche Kanüle eingebunden war und das noch auf Acetylcholinverdünnungen von 1 : 100 Millionen reagierte. Le Heux stellte Versuche am Kaninchen- und Katzendarm an.

Wir benützten folgendes, von Führer 1918 angegebene und von Minz 1932 abgeänderte Verfahren:

Kopf und Schwanz des Blutegels (hirudo medicinalis) werden abgeschnitten, der verbleibende Muskelschlauch wird an den pigmentierten Seitenlinien aufgeschnitten und das Nervensystem von der Rückenmuskelplatte vollständig abgelöst. Die beiden Teile des querhalbierten Muskels werden an zwei Luftkanülen, die in je zwei

etwa 20 ccm fassende Glasbehälter ragen, so eingespannt, daß das freie Ende mit dem Schreibhebel eines Kymographen in Verbindung gebracht wird. Von den beiden Gläsern wird das eine mit Kaltblüter-Ringerlösung, das andere mit Physostigmin-Kaltblüterringerlösung 1 : 250,000 gefüllt. Die Behälter sind unten offen, sodaß die Versuchsflüssigkeit nach Bedarf jederzeit abgelassen werden kann. Durch die einragende Luftkanüle wird ständig von unten Luft geperlt, um eine rasche und genügende Durchmischung zu gewährleisten.

Diese Versuchsanordnung hat gegenüber anderen den Vorteil, daß sie wesentlich einfacher ist, und daß der Egelmuskel weit weniger empfindlich ist als Warmblüterorgane. Dabei ist das Verfahren doch ebenso fein und zuverlässig.

Die Untersuchungen nachstehender chemischer Stoffe führte ich so durch, daß von einer bestimmt-prozentigen Stammlösung eine Reihe von Verdünnungen hergestellt wurde. Mit der stärksten beginnend wurde je 1 ccm fortlaufend in das bis 20 ccm aufgefüllte Versuchsglas mit dem Egelmuskel gegeben und nach jeder „Impfung" wieder 1 ccm abgelassen. Somit konnte der Schwellenwert ermittelt werden, bei dem die einzelnen Lösungen sichtbar auf den Muskel wirkten.

Es wurde vor und nach jeder Versuchsreihe geprüft, auf welche bestimmte Acetylcholin-Verdünnung der Muskel ansprach, sodaß man nicht nur aus der Art der Kurve, sondern auch aus der Konzentration des Acetylcholins feststellen konnte, ob und wie der Stoff auf den Muskel gewirkt hatte.

1. *Pikrinsäure,* 1,2%ige, gesättigte, wäßrige Lösung. Die Pikrinsäure verlängert den Muskel, d. h. die Kurve auf dem Kymographen fällt ab; die erste Wirkung setzte bei dem in Ringerlösung aufgehängten Muskel bei einer Verdünnung von 1 : 1, bei dem in Physostigminlösung aufgehängten Muskel bei 1 : 2 ein. Acetylcholin war danach auf den Muskel noch wirksam. Bei stärkeren Pikrinsäurekonzentrationen litt der Muskel merklich, sodaß er bereits nach etwa 10 Versuchen unbrauchbar war.

In diesem Rahmen stellten wir weiter einige Untersuchungen mit Pikrinsäure-Acetylcholingemischen an. Wir versetzten wäßrige Acetylcholinlösungen von bestimmter Konzentration mit kon-

zentrierter, gesättigter Pikrinsäurelösung und stellten dabei fest, daß die Acetylcholinwirkung durch Pikrinsäure gehemmt, bzw. verdeckt wird. Wir bekamen bei diesen Versuchen am sensibilisierten Muskel bei einer Acetylcholinverdünnung 1 : 100 000 noch eine ausgesprochene Acetylcholin-Kurve, bei 1 : 1 Million eine uncharakteristische, flache Kurve, bei 1 : 10 Millionen schon keine mehr und bei 1 : 100 Millionen eine ausgesprochene Pikrinsäure-Kurve. Wurde aber nach diesen Verdünnungen, welche die uncharakteristischen Kurven ergaben, gespült, so sah man am Muskel nachträglich die ausgesprochene Acetylcholinwirkung. Ferner untersuchten wir das Kalium-, Natrium- und Ammoniumsalz der Pikrinsäure, die sich in entsprechend großer Verdünnung wie verdünnte Pikrinsäure verhalten. Die Acetylcholinempfindlichkeit war bei den von uns gewählten hohen Verdünnungen nicht beeinträchtigt, nur nach Behandlung mit stärker konzentrierten Lösungen war sie etwa um den 10. Teil herabgesetzt.

2. *Trichloressigsäure,* wäßrige, 20%ige Lösung. Am Ringermuskel erfolgt mäßige Kontraktion bei einer Verdünnung von 1 : 10, bei 1 : 5 wird die Kurve ähnlich der des Acetylcholins. Am sensibilisierten Muskel tritt die erste Wirkung bei 1 : 100 ein, starke Kontraktion sah man bei 1 : 10.

3. *Eisessig,* wäßrige, 10%ige Lösung.

Die langsam kontrahierende Wirkung des Eisessigs setzt beim sensibilisierten Muskel bei einer Verdünnung von 1 : 10 ein. Beim Ringermuskel ist in dieser Konzentration keine Veränderung festzustellen, er reagierte erst bei einer 50%igen Lösung mit langsamer Kontraktion. Sowohl nach Essigsäure wie nach Trichloressigsäure war die Acetylcholin-Empfindlichkeit des Muskels nicht gestört

4. *Ferrocyanwasserstoffsäure,* wäßrige 10%ige Lösung.

An beiden Muskeln war bei dieser Konzentration keine Wirkung zu beobachten.

5. *Sulfosalicylsäure,* wäßrige, 20%ige Lösung.

Die Sulfosalicylsäure schädigte den Muskel nicht, er sprach danach auf Acetylcholin unverändert an. Die Wirkung auf den Muskel war folgende:

Auf den Ringermuskel:	Auf den Physostigminmuskel:
1 : 50 keine Kontraktion	1 : 200 keine Kontraktion
1 : 20 mäßige Kontraktion	1 : 100 leichte Kontraktion
1 : 10 starke Kontraktion	1 : 50 mäßige Kontraktion

6. *Oxalsäure,* wäßrige Lösung von 1 : 15.

Auf den Ringermuskel wirkte sichtbar erst eine Konzentration von 1 : 1 und zwar in Form langsamer leichter Kontraktion. Auf den Physostigminmuskel wirkte bereits 1 : 20 leicht, 1 : 10 stärker kontrahierend. Höhere Konzentrationen schädigten den Muskel, sodaß eine anschließende Auswertung mit Acetylcholin nicht mehr möglich war.

7. *Aceton.*

Die erste Wirkung des Acetons besteht in einer Verlängerung des Muskels, die beim Ringermuskel bei einer wäßrigen Verdünnung von 1 : 1, beim sensibilisierten bei 1 : 10 eintritt. Läßt man dabei noch stärkere Konzentrationen länger als eine halbe Minute einwirken, so tritt ganz plötzlich stärkste Kontraktion mit nachfolgender Entspannung ein, Zuckungen, die in raschem Rhythmus den Muskel erschöpfen und für weitere Verwendung unbrauchbar machen.

8. *Dioxan.*

Die Dioxanwirkung ist eine ähnliche wie die des Acetons, wobei die ersten Wirkungen bei 1 : 2, bzw. bei 1 : 10 einsetzen.

9. *Methyl-, Aethyl- und Propylalkohol.*

Die Alkohole wirkten ganz verschieden auf den Muskel, zum Teil kontrahierend, zum Teil erschlaffend, jedenfalls sprach der Muskel so stark an, daß diese Alkohole ebenso wie Aceton und Dioxan für unsere Zwecke nicht verwendet werden können.

Ueberblickt man die von uns untersuchten Eiweißfällungsmittel, so ergibt sich, daß Oxalsäure, Aceton, Dioxan und die Alkohole wegen ihrer den Blutegelmuskel schädigenden Wirkung für unsere Zwecke ungeeignet sind. Dagegen ist der Einfluß von Pikrinsäure, Trichloressigsäure, Eisessig, Ferrocyanwasserstoffsäure und Sulfosalicylsäure auf den Egelmuskel so gering, daß ihre Anwesenheit nicht stört, wenn darin gelöstes Acetylcholin am Blutegel ausgewertet werden soll. Aus obigen Versuchen lassen sich „Schwellenwerte" berechnen. Wir sind ausgegangen von Lösungen bekannten Gehaltes, die wir in das Versuchsglas gossen, in dem der

Egelmuskel aufgespannt war; der Inhalt dieses Versuchsglases war 20 ccm. Es läßt sich also berechnen, in welchen Mengen die untersuchten Stoffe noch wirkungslos waren oder schon wirkten. Diese Berechnung gibt uns dann die „Schwellenwerte". Sie sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Im Stab 2 ist angegeben die Konzentration der Stammlösung, aus der wir die Verdünnungen herstellten, im Stab 3 und 4 diejenige Menge des reinen Stoffes, die in 20 ccm Ringerlösung, bzw. physostigminhaltiger Ringerlösung gelöst war, die also auf den Egel einwirkte. Nr. 1 bis 5. sind die Stoffe, die auf den Egelmuskel keinen schädigenden Einfluß hatten, Nr. 6. bis 11., diejenigen, die wir als ungeeignet bezeichnen mußten. Die Buchstaben a) und b) unter den einzelnen Stoffen im ersten Stab bedeuten a) in Ringerlösung, b) in Physostigmin-Ringerlösung gewertet.

Untersuchter Stoff	Konzentration der Stammlösung	es war noch unwirksam	es wirkte eben
1. Pikrinsäure	1,2% wäßrig		
a)		10 mg	12 mg
b)		5 mg	6 mg
2. Trichloressigsäure	20% wäßrig		
a)		10 mg	20 mg
b)		1 mg	2 mg
3. Eisessig	10% wäßrig		
a)		100 mg	500 mg
b)		5 mg	10 mg
4. Ferrocyanwasserstoffsäure	10% wäßrig		
a)		100 mg	—
b)		100 mg	—
5. Sulfosalicylsäure	20% wäßrig		
a)		4 mg	10 mg
b)		1 mg	2 mg
6. Oxalsäure	6,5% wäßrig		
a)		20 mg	33 mg
b)		1 mg	2 mg

Untersuchter Stoff	Konzentration der Stammlösung	es war noch unwirksam	es wirkte eben
7. Aceton	rein		
a)		200 mg	500 mg
b)		20 mg	50 mg
8. Dioxan	rein		
a)		200 mg	300 mg
b)		20 mg	50 mg
9. Methylalkohol	rein		
a)		100 mg	200 mg
b)		20 mg	50 mg
10. Aethylalkohol	rein		
a)		100 mg	200 mg
b)		300 mg	500 mg
11. Propylalkohol	rein		
a)		1 gr	2—5 gr
b)		0,3 gr	0,5—1 gr

Goldchlorid und Reineckesäure sind für die Darstellung der entsprechenden Acetylcholinsalze besonders wichtig. Wir wollten daher wissen, ob diese Acetylcholinsalze sich unmittelbar am Egelmuskel auswerten lassen, unmittelbar, d. h. also in ihrer wäßrigen Lösung.

Reineckesäure und das Ammoniumsalz der Reineckesäure sind ohne wesentlichen Einfluß auf den Blutegelmuskel, während Goldchlorid in gewisser Konzentration nach längerer Einwirkungszeit eine langsam ansteigende und langdauernde Kontraktion hervorruft. Der errechnete „Schwellenwert" für Goldchlorid ist aber wesentlich höher, als der des Goldchlorids im Acetylcholingoldsalz. Während sowohl am Ringer-, wie am sensibilisierten Muskel die langsame Kontraktion auf Goldchlorid erst bei einer Menge von 2—2,5 mg Goldchlorid im Versuchsglas auftritt, kontrahiert sich der Muskel schon bei 0,0001 mg Acetylcholin-Goldsalz im Versuchsglas auf die artspezifische Acetylcholin-Weise. Praktisch wird also bei den normalen, geringen Acetylcholinmengen niemals eine störende Goldwirkung bei der biologischen Auswertung eintreten. Dies gab schon den ersten Hinweis für die Brauchbarkeit der Acetylcholinsalze bei der biologischen Bestimmung am Blutegelmuskel.

Die biologische Untersuchung aequimolekularer Mengen Acetylcholin-Goldsalz und Acetylcholin-Reineckesalz brachten den wert-

vollen Erfolg, daß diese Salze gerade ebenso wirkten, wie die aequimolekulare Menge Acetylcholin selbst. Wir hatten nämlich gleiche molare Lösungen von Acetylcholin-Reineckat und Acetylcholin-Goldsalz einerseits und Acetylcholinchlorid andererseits geprüft. Es zeigte sich dabei, daß beim Vergleichen der Kurven die Wirksamkeit der Acetylcholinsalze gegenüber dem Acetylcholinchlorid nur ganz geringe Abweichungen bewirkte. Bei einem wenig empfindlichen Muskel bekamen wir bei einer Verdünnung von 1 : 5 Millionen am sensibilisierten Muskel zwei nahezu gleichwertige Kurven, beim Ringermuskel bei einer Verdünnung von 1 : 100. An einem sehr empfindlichen sensibilisierten Muskel erzielte ich sogar bei einer Verdünnung von 1 : 1 Billion mit Acetylcholin-Reineckat und Acetylcholinchlorid zwei fast gleichlaufende Kurven.

Zusammenfassung.

Die Ergebnisse sind eindeutig:

1. Für die biologische Auswertung des Acetylcholins nach dem von Führer angegebenen Verfahren eignen sich auch die verdünnten Lösungen des Acetylcholin-Goldsalzes und des Acetylcholin-Reineckesalzes. Das bedeutet, daß es damit möglich ist, mitten im Arbeitsgang ein möglicherweise anfallendes Gold- oder Reineckesalz biologisch untersuchen zu können; diese Untersuchung erlaubt die Feststellung, ob das fragliche Salz Acetylcholin enthält oder nicht.

2. Die bekannten und viel gebräuchlichen Eiweißfällungsmittel Pikrinsäure, Trichloressigsäure, Eisessig, Ferrocyanwasserstoffsäure und Sulfosalicylsäure stören bei der biologischen Untersuchung auf Acetylcholin nicht, wenn die Konzentration dieser Stoffe nicht über einem gewissen Schwellenwert liegen. Diese Schwellenwerte haben wir bestimmt (Tabelle). Das bedeutet, daß es dadurch möglich ist, daß man bei der Untersuchung eiweißfreier Blut- oder Gewebsauszüge mitten im Arbeitsgang auf die Anwesenheit des Acetylcholins prüfen kann, ohne daß die verwendeten Eiweißfällungsmittel erst vorher entfernt werden müssen. Die Untersuchungsmöglichkeiten sind durch diese Erkenntnis wesentlich erleichtert und vereinfacht.

(Abgeschlossen März 1936).

Zum Schlusse dieser Arbeit möchte ich mich noch der angenehmen Aufgabe entledigen, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Kapfhammer für die Ueberlassung des Themas und für seine wertvollen Ratschläge herzlich zu danken.

Literatur.

1. Führer: Biochem. Zeitschr. *77*, 408 (1916). Archiv für experimentelle Pharmakol u. Pathol. *82*, 71 (1918).
2. Guggenheim und Löffler: Biochem. Zeitschr. *72*, 303 (1916).
3. Minz: Arch. f. exp. Phar. und Path. *168*, 292 (1932).
4. Strack und Mitarbeiter: Hoppe-Seylers Zeitschr. für physiol. Chemie *238*, 183 (1936).

Lebenslauf.

Am 28. März 1911 wurde ich, Werner von Ammon, als Sohn des damaligen kgl. bayerischen Amtsrichters Wilhelm von Ammon in Ingolstadt a. Donau geboren.

Ich besuchte 4 Jahre die Volksschule in Augsburg, wohin mein Vater 1914 versetzt worden war, und in Rothenburg o. T. — Danach besuchte ich 9 Jahre das humanistische Gymnasium bei St. Anna in Augsburg, an dem ich Ostern 1930 das Abitur bestand.

Dem anschließenden Medizinstudium oblag ich 6 Semester in Erlangen, eines in Königsberg, eines in München und drei in Freiburg (Breisgau).

Die ärztliche Vorprüfung legte ich Ende des Wintersemesters 1932/33 in Erlangen ab, das medizinische Staatsexamen bestand ich am 25. Januar 1936 in Freiburg.